

海水中胞外酶及其与赤潮发生关系研究进展^{*}

欧林坚 黄邦钦^{**} 洪华生 王大志

(厦门大学海洋环境科学教育部重点实验室/环境科学研究中心, 厦门 361005)

【摘要】 胞外酶在水生生态系统的物质循环和能量转化过程中具有重要作用, 其研究对深入了解海洋中碳的生物地球化学循环过程及赤潮藻在赤潮发生过程中的应对机制具有重要意义. 本文综述了海水中胞外酶的研究方法、活性分布特征、粒径分布特征、影响调控机制及生态学意义等方面的研究进展, 同时介绍胞外酶作为一项新型营养状况指标的意义.

关键词 胞外酶 赤潮 富营养化 碱性磷酸酶

文章编号 1001- 9332(2003) 07- 1197- 03 中图分类号 Q178.53 文献标识码 A

Advances in researches of aquatic ectoenzyme and its relationship with red tide. OU Linjian, HUANG Bangqin, HONG Huasheng, WANG Dazhi (Key Laboratory of Marine Environmental Sciences of MOE/Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China).-Chin. J. Appl. Ecol., 2003, 14(7): 1197~ 1199.

Ectoenzymes play an important role in the material cycle and energy conversion in aquatic ecosystem. The researches of ectoenzyme are of significance in further understanding the marine carbon biogeochemical cycle and the countermeasures of algae under bloom conditions. In this paper, the research methods, characteristic activity and size distribution, controlling factors and their ecological significances of algal ectoenzymes were reviewed, and ectoenzyme introduced as one kind of new trophic state index.

Key words Aquatic ectoenzyme, Red tide, Eutrophication, Alkaline phosphatase.

1 引言

胞外酶是指那些在胞内合成的穿过细胞质膜后发挥水解作用的酶. 它们有的镶嵌在细胞膜上, 有的存在于周质空间内, 有的则以游离态释放到外部环境中. 水生生态系统中的有机物大多是以高分子聚合物的形式存在. 这些高分子聚合物(分子量> 1500Da)只有通过胞外酶的作用, 才能水解成可穿过细胞质膜而被吸收利用的小分子物质(大约为600 Da或更小)^[1, 26]. 这一关键的生化过程是调节海洋有机营养平衡的重要生态因子, 也是众多异养微生物赖以生存的基础. 胞外酶活性不仅能够反映水环境中有机物的数量和质量, 还能反映藻类对有机组分的改造程度及该有机组分对藻类生长繁殖的营养贡献^[18]. 胞外酶的研究对于深入了解海洋中碳的生物地球化学循环过程及赤潮藻在赤潮发生过程中的机制具有重要意义. 目前该领域已成为海洋生态学的研究热点, 海洋水体中胞外酶的研究也多有报导^[3, 4, 10, 19~ 21].

2 胞外酶活性的研究现状

2.1 胞外酶活性研究方法

从20世纪30年代证明海水中胞外酶的存在后, 研究人员对水环境的胞外酶活性进行了研究^[7, 8, 14, 16]. 这些研究都是采取添加人工底物模拟物, 计算酶对人工海水中酶活性的高低, 即荧光模拟底物法(Fluoregenic Model Substrates, FMS)^[18, 32]. 早期获得广泛使用的底物主要有Methylumbel-

liferyl (MUF) 单糖底物或是氨基酸底物. 然而Feller^[10]提出, 由于低分子量的MUF底物无法有效地模仿三维结构的生物高聚物, 所以分别用小分子量的底物模拟物与实际的高聚物所获得的酶动力参数存在极大差异. 此外, Martinez等^[27]的研究结果表明, MUF底物的水解也有可能发生在微生物的周质空间内, 采用此类底物实际测得的酶活性包括了胞外酶活性与周质空间酶活性. 在此基础上, Arnosti等^[1]设计了一系列的荧光标记多聚糖, 经由低压凝胶电泳色谱法检测水样中的胞外酶活性. 采用此方法可以检测到传统的MUF底物法无法检测的胞外酶活性.

2.2 胞外酶活性的分布特征

胞外酶活性的变化及其分布特征可作为反映微生物活性及指示水环境营养状况的良好指标^[25]. Chr st(1989)认为, 胞外酶活性在赤潮发生过程的不同阶段有显著的变化. 在赤潮发生阶段其活性较低, 而在赤潮衰减阶段胞外酶活性显著升高. 这一变化是对水体中有机物组分变化的一种积极的响应, 反映了赤潮藻在环境变动条件下对有机物利用的最佳对策^[32]. 由于胞外酶的作用不同, 不同胞外酶活性的时间分布也大不相同. Chr st^[9]、Nausch等^[28]的研究结果表明, 在赤潮发生阶段, 一些胞外酶(如碱性磷酸酶)的活性在浮游植物生长的高峰期达到最大值, 而另一些胞外酶活性在浮游

^{*} 国家重点基础研究发展规划资助项目(2001CB409706).

^{**} 通讯联系人. bqhuang@jingxian. xmu. edu. cn.

2002- 12- 18收稿, 2003- 01- 21接受.

植物衰败或是生长的末期达到最大值。Hoppe^[17]在研究波罗的海的富营养海湾时发现,越靠近外海,胞外酶活性会规律性地降低。

2.3 胞外酶活性的影响因素

不同的生物或非生物因素(如温度、pH、腐殖质、溶解氧状况、氢硫化物、UV-B 辐射、重金属离子)会影响胞外酶的合成及其活性^[29]。Vetter 在 1994 年对几丁酶、肽酶、酯酶的 Q_{10} 进行了研究,发现温度对几丁酶的影响最显著(很少出现 $Q_{10} \leq 2$);肽酶的温度系数最小(70%的 $Q_{10} \leq 2$);而海水样品中酯酶的 Q_{10} 有 33% 大于 2。这表明温度对不同的酶活性影响不同。黄邦钦等^[23]在厦门西海域的实验结果表明,该海域各形态的磷、硝态氮、溶解氧、化学耗氧量、初级生产力、细菌生长速度对碱性磷酸酶活性有较明显的影响。其中除细菌生长速度与碱性磷酸酶活性成正相关以外,其余均为负相关。Garde^[12]等的研究表明,UV-B 对胞外酶的活性有较强的抑制作用。暴露在 UV-B 下的胞外酶活性降低,其原因可能是由于水中游离态或固着态酶的光降解作用。此外,酶及其底物之间的相互影响也是非常复杂的。肽酶降解蛋白质的目的可能并不仅仅是为了提供氮源,也可以提供碳源。这就是为什么葡萄糖也能够抑制肽酶的原因^[9]。Hoppe 等^[19]认为,类似的机制也发生在深海的磷酸酶上。那儿的磷酸酶水解有机磷酸盐复合物的目的更多的是为了满足细菌对碳源的需求。

2.4 营养盐对胞外酶的影响

营养盐对胞外酶活性有显著的影响,在此特将营养盐从影响因素中提出,强调说明。Rybcyzk 等(1996)认为,营养盐浓度对有机物的分解率及胞外酶活性有促进作用^[2]。Gambin 等^[11]认为,磷对碱性磷酸酶活性主要有两方面的影响:一方面,溶解于水中的正磷酸盐会与底物竞争,抑制酶的活性;另一方面,胞内的正磷酸盐会调控酶的活性。对于大多数的细菌及藻类来说,细胞内磷的耗尽常会导致碱性磷酸酶的合成。Boetius(1996)在长时间(63d)培养实验中发现添加葡萄糖和糖胶(氨基乙酸)时,在前 30d 内分别降低了 α -葡萄糖苷酶和肽酶的活性,这是由于所加的小分子有机物已基本满足细菌生长需要,从而抑制了酶的合成^[31];黄邦钦等^[22]批量培养实验结果表明,介质中溶解无机磷和小分子溶解有机磷的浓度是激发碱性磷酸酶发生变化的主要调控因子,大分子溶解有机磷的浓度对碱性磷酸酶的作用不明显,但碱性磷酸酶的增大可加速微藻利用大分子溶解有机磷的速率^[22]。Chr st^[8]在总结前人工作及结合自己的研究结果的基础上给出了细菌、藻类与营养物质的关系及调控机制的模型(图 1)。

2.5 胞外酶的粒径分布特征

胞外酶按粒径可划分为游离态($< 0.2 \mu\text{m}$)和固着态($> 1 \mu\text{m}$)^[12]。Hollibaugh 等^[16]从能量方面考虑,认为酶主要是以颗粒态附着在细胞表面,而不是溶解在水中。Hoppe^[17]将磷酸酶、葡萄糖苷酶、亮氨酸氨肽酶在 $< 20 \mu\text{m}$ 的范围内分出 6 个粒径,各种酶的粒径分布特征均不相同,反映出胞外酶来

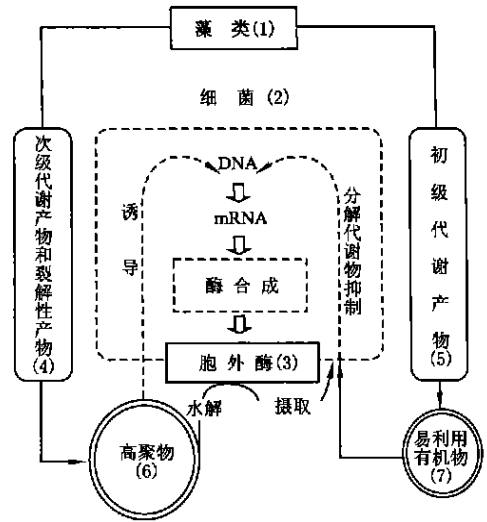


图 1 细菌、藻类与易利用有机物及高聚物之间的关系及胞外酶的调控机制

Fig. 1 Relationship between bacteria, algae and readily utilizable dissolved organic matter (UDOM) and polymeric (DOM), and the mechanisms of regulation of ectoenzymes.

1. Algae, 2. Bacteria, 3. Ectoenzyme, 4. Secondary metabolites and lytic products, 5. Primary metabolites, 6. Polymeric DOM, 7. UDOM.

源的复杂性。Konopka 等^[26]在格兰氏阴性细菌的实验中发现,超过 98% 的肽酶、 α -(β) 葡萄糖苷酶是附着在细胞表面的酶。Garde 等^[12]认为,碱性磷酸酶主要存在于粒径 $> 0.2 \mu\text{m}$ 的颗粒上。游离态的碱性磷酸酶仅占碱性磷酸酶的 9% ~ 19%,而 78% 的磷酸酶活性存在于粒径 $> 1 \mu\text{m}$ 的颗粒上。Gambin 等^[11]的研究结果表明,对于 meso/ micro 级的浮游生物,几乎 100% 的碱性磷酸酶来源于游离态的酶。至于 nano/ pico 级的浮游生物,仅 50% 的碱性磷酸酶来源于游离态的 APA。可见,不同水体中的胞外酶粒径分部特征是不同的。

2.6 赤潮生物的胞外酶特性

在一次赤潮的形成过程中,藻类和环境因素相互作用的结果,使得某一种或几种藻类能够通过竞争淘汰其它藻类成为优势种,有理由相信是某些特殊的条件决定了赤潮生物的优势地位^[30]。赫氏藻(*Emiliania huxleyi*)是一在全球沿岸和外海水域都有广泛分布并极易形成大面积赤潮的藻类^[13]。在磷限制的情况下,*E. huxleyi* 会成为群落中的唯一的优势种。Riegman 等^[30]的研究结果表明,*E. huxleyi* 在竞争磷上有两方面的优势:(1) *E. huxleyi* 与无机磷的亲合力在所记录到的浮游植物种类中是最高的。(2) *E. huxleyi* 的碱性磷酸酶活性与其它选择分析的 10 种藻类相比,也是最高的。作者认为,赤潮生物可能在胞外酶的活性上占有某些生态位上的优势,使得赤潮生物在同样受限的条件下,能够竞争过其它的藻类,成为优势种。

2.7 胞外酶——新型营养状况指标

当前,水体富营养化导致赤潮的频繁爆发已成为全球关注的焦点。为了更好地预防、预报赤潮的发生,更好地对水环境进行管理,首先必须对水环境的营养状况给予准确的评价。传统的评价方法是 Carlson^[5]基于 3 个评估指标(透明

度、Cha、总磷酸盐浓度)提出的营养状况指数(Trophic State Index, TSI),该方法目前仍得到广泛的应用。然而,由于水生环境的异常复杂性,上述3种指标都不能有效地对水环境单独进行评估。鉴于这3种指标都直接或间接地与浮游植物的生物量相关,Carlson等^[6]提出生物指标的想法。Hendel等^[15]应用胞外酶活性评价Hengsen水质处理厂处理前后的水质状况。Kiersztyn等^[25]在此基础上提出了酶TSI指标。这一指标在评估水环境的营养状况时,是非常有效的。首先,酶TSI指标与3种经典参数指标密切相关,适用范围更广。其次,基于酶活性的TSI参数相较于其它方法,能更准确地评估间歇性赤潮爆发期间的水质营养状况,并能更准确地将富营养区不同级别加以区分。此外,酶TSI指标在描述水生环境营养状况的同时,还能反映水体中微生物活性。目前,我们正参与研究我国典型赤潮高发区重要赤潮生物的碱性磷酸酶对于水环境,尤其是不同营养状况水环境的生理生态的响应情况,目的在于弄清在赤潮发生、发展过程中碱性磷酸酶的活力分布及其与营养物质(特别是磷)的关系,为揭示赤潮发生机制提供有价值的信息。

参考文献

- 1 Arnosti C, Keith SC, Blough NV. 2000. Application of fluorescence spectroscopic techniques and probes to the detection of biopolymer degradation in natural environments. *Mar Chem*, **71**: 321~330
- 2 Alvarez S, Guerrero MC. 2000. Enzymatic activities associated with decomposition of particulate organic matter in two shallow ponds. *Soil Biol Biochem*, **32**: 1941~1951
- 3 Billen G. 1991. Protein degradation in aquatic environments. In: Chrost RJ ed. *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. New York: Springer. 123~143
- 4 Boetius A, Lochte K. 1994. Regulation of microbial enzyme degradation of organic matter in deep-sea sediments. *Mar Ecol Prog Ser*, **104**: 299~307
- 5 Carlson RE. 1977. A trophic state index for lakes. *Limnol Oceanogr*, **22**(2): 361
- 6 Carlson RE, Simpson J. 1996. A Coordinator's Guide to Volunteer Lake Monitoring Methods. North American Lake Management Society. 96
- 7 Cernella AD, et al. 1983. The utilization of inorganic phosphorus and organic compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part iv. CRC. *Crit Rev Microb*, **10**: 317~391
- 8 Chrost RJ. 1990. Microbial enzymes in aquatic environments. In: Overbeck J, Chrost RJ eds. *Aquatic Microbial Ecology, Biochemical and Molecular Approaches*. New York: Springer. 47~79
- 9 Chrost RJ. 1991. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial enzymes. In: Chrost RJ ed. *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. New York: Springer. 29~84
- 10 Feller G, Narinx E, Arpigny JL, Aittaleb M. 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microb Rev*, **18**: 189~202
- 11 Gambin F, Bogue G, Jamet D. 1999. Alkaline phosphatase in a littoral Mediterranean marine ecosystem: role of the main plankton size classes. *Mar Environ Res*, **47**: 441~456
- 12 Garde K, Gustavson K. 1999. The impact of UV-B on alkaline phosphatase activity in phosphorus-depleted marine ecosystems. *J Exp Mar Biol Ecol*, **238**: 93~105
- 13 Gayoso AM. 1995. Bloom of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) in the western South Atlantic Ocean. *J Plankton Res*, **17**(8): 1717~22
- 14 Grossart HP, Ploug H. 2001. Microbial degradation of organic carbon and nitrogen on diatom aggregates. *Limnol Oceanogr*, **6**: 267~277
- 15 Hendel B, Marxsen J, Fiebig D, Preub G. 2001. Extracellular enzyme activities during slow sand filtration in a water recharge plant. *Wat Res*, **35**(10): 2484~2488
- 16 Hollibaugh JT, Azam F. 1983. Microbial degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnol Oceanogr*, **28**: 1104~1116
- 17 Hoppe HG. 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl substrates. *Mar Ecol Prog Ser*, **11**: 299~308
- 18 Hoppe HG. 1993. Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ eds. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Boca Raton: Lewis Publishers. 423~431
- 19 Hoppe HG, Ullrich S. 1999. Profiles of ectoenzymes in the Indian Ocean: phenomena of phosphatase activity in the mesopelagic zone. *Aquat Microb Ecol*, **19**: 139~148
- 20 Huang Bangqin, Hong Huasheng. 1999. Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorus by algae in subtropical coastal waters. *Mar Pollut Bull*, **39**(12): 205~211
- 21 Huang B-Q(黄邦钦), Huang S-Y(黄世玉), Wen Y(翁妍), Hong H-S(洪华生). 2000. Effect of dissolved phosphorus on alkaline phosphatase activity in marine microalgae. *Acta Oceanol Sin* (海洋学报), **19**(2): 29~35
- 22 Huang B-Q(黄邦钦), Huang S-Y(黄世玉), Weng Y(翁妍), Hong H-S(洪华生). 1999. Effect of dissolved phosphorus on alkaline phosphatase activity in marine microalgae. *Acta Oceanol Sin* (海洋学报), **21**(1): 55~60 (in Chinese)
- 23 Huang B-Q(黄邦钦), Hong H-S(洪华生), Xue X-Z(薛雄志). 2000. Distribution and controlling factors of alkaline phosphatase activity in western Xiamen waters. *Acta Oceanol Sin* (海洋学报), **22**(1): 62~68 (in Chinese)
- 24 Jansson M, Olsson H, Pettersson K. 1988. Phosphatase: origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia*, **170**: 157~175
- 25 Kiersztyn B, Siuda W, Chrost RJ. 2002. Microbial ectoenzyme activity: useful parameters for characterizing the trophic conditions of lakes. *Polish J Environ Studies*, **11**(4): 367~373
- 26 Konopka A, Zakhmova T. 2002. Evaluation of methods to solubilize and analyze cell-associated ectoenzymes. *J Microb Methods*, **51**: 273~282
- 27 Martinez J, Smith DC, Steward GF, Azam F. 1996. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat Microb Ecol*, **10**: 223~230
- 28 Nausch M. 1998. Alkaline phosphatase activities and the relationship to inorganic phosphate in the Pomeranian Bight (southern Baltic Sea). *Aquat Microb Ecol*, **16**: 87~94
- 29 Nausch M, Nausch G. 2000. Stimulation of peptidase activity in nutrient gradients in the Baltic Sea. *Soil Biol Biochem*, **32**: 1973~1983
- 30 Riegman R, Stolte W, Anna AM, et al. 2000. Nutrient uptake and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) activity of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) during growth under N and P limitation in continuous cultures. *J Phycol*, **36**: 87~96
- 31 Song F-H(宋福行), Jiao N-Z(焦念志). 2001. The controlling factors of extracellular enzymatic activities. *Mar Sci* (海洋科学), **25**(9): 16~18 (in Chinese)
- 32 Zheng T-L(郑天凌), Xu M-Z(徐美珠), Zhang Y(张瑶), Wang F(王斐). 2001. EEA—A new, key parameters of marine ecology and its application. *J Oceanogr Taiwan Str* (台湾海峡), **20**(4): 453~461 (in Chinese)

作者简介 欧林坚,女,1979年生,硕士生,主要从事海洋生态学 and 微生物生态方面研究。E-mail: ouorange@sohu.com